

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-75743

(43) 公開日 平成8年(1996)3月22日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/543

5 4 5 A

33/53

D

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-242045

(22) 出願日 平成6年(1994)9月8日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年8月1日、
株式会社エム・シー・アイ発行の「日本マス・スクリー
ニング学会誌第4巻第2号」に発表

(71) 出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所
熊本県熊本市清水町大窪668番地

(72) 発明者 武田 堅吾

熊本県菊池郡西合志町須屋1565

(72) 発明者 中村 公俊

熊本県熊本市三郎1丁目14-39-303

(72) 発明者 遠藤 文夫

熊本県熊本市出水7丁目733-103

(72) 発明者 松田 一郎

熊本県熊本市渡鹿1丁目16-1-35

(54) 【発明の名称】 競合抗体を利用するセルロプラスミンの測定方法

(57) 【要約】

【目的】 生体成分に対する抗体を利用した、血中セル
ロプラスミンの免疫学的測定方法において、被検試料の
前希釈操作を軽減、あるいは削除させることのできる方
法を提供する。

【構成】 サンドイッチ酵素免疫測定法等のサンドイッ
チ型免疫学的測定方法に基づく生体成分の測定におい
て、生体成分であるセルロプラスミンを捕捉する固相抗
体と被検試料中のセルロプラスミンとの反応時に、固相
抗体と反応性を同じくする遊離抗体をセルロプラスミン
を含む被検試料に添加することにより、固相抗体と遊離
抗体との間で生じるセルロプラスミンに対する競合反応
を利用し、セルロプラスミンが固相抗体側に過剰に結合
する量を制限するものである。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ型免疫測定方法において、希釈操作を施さないか選択的に希釈操作を施した生体試料を被検試料とし、被検試料中のセルロプラスミンとセルロプラスミンを捕捉する固相抗体との反応時に、当該固相抗体と反応性を同じくする遊離抗体を添加し、固相抗体と遊離抗体との間に競合を生ぜしめることを特徴とするセルロプラスミンの測定方法。

【請求項2】 サンドイッチ型免疫測定方法がサンドイッチ酵素免疫測定法(以下、サンドイッチELISAと略称することがある)である請求項1記載のセルロプラスミンの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生体成分に対する抗体を利用した、生体成分、とりわけセルロプラスミンの測定方法に関する。さらに詳細には、酵素免疫測定法(以下、ELISAと略称することがある)等のサンドイッチ型免疫学的測定法に基づく血中セルロプラスミンの測定において、固相抗体と被検試料中のセルロプラスミンとの反応時に、固相抗体と反応性を同じくする遊離抗体をセルロプラスミンを含む被検試料に添加することにより、固相抗体と遊離抗体との間で生じるセルロプラスミンに対する競合反応を利用し、セルロプラスミンが固相抗体側に結合する量を制限するものである。これにより、従来不可欠の被検試料の前希釈操作を軽減、あるいは削除させることのできる方法を提供する。従って、本発明は生体成分、セルロプラスミンの測定に生化学的あるいは医学的意義が存在する分野、例えば臨床診断の分野において利用価値を有する。

【0002】

【従来技術および発明が解決しようとする問題点】 セルロプラスミンは160,000の分子量を有し、1分子中に8個の割合で銅を含む青色の血漿タンパク質で、肝臓においてアポセルロプラスミンが合成される際に銅が取り込まれてオキシダーゼ活性を持ったホロセルロプラスミンとなり、血液中を循環している。銅代謝における役割はなお不明な点があるが、先天性銅代謝異常症であるウィルソン病の患者血液中において、セルロプラスミン濃度は著明に低下していることが知られている(Neil A. Holtzman, et al., J. clin. Invest., 46, 6, (1967))。即ち、血漿中に存在するセルロプラスミンの量は、一般健常人では17~37mg/dlに分布し、ウィルソン病患者ではほとんどが5mg/dl以下である。このことから、セルロプラスミンの測定はウィルソン病の診断に広く利用されている。

【0003】 ウィルソン病は肝硬変、錐体外路症状およびKayser-Fleischer角膜輪を三主徴とする先天性銅代謝異常症の一つであり、常染色体劣性遺伝型式をとる。本

2

症の成因は不明な点が多いが、日常摂取された食品銅が、肝、大脳基底部、角膜あるいは腎といった主要臓器に過剰蓄積し、各組織の細胞変性や壊死を起こしていると考えられている(Scheinberg IH, Sternlieb I: Wilson's disease. WB Saunders Co., Philadelphia, 1984)。治療法は、組織に沈着した銅と結合して体外に銅を排泄する作用を有するペニシラミン、トリエン等の金属キレート剤の投与および銅制限食である。また、早期に治療を開始すれば予後は良い。

【0004】 セルロプラスミンの測定法としては、血清中のオキシダーゼ活性測定や、血清銅値の測定よりセルロプラスミンの量を換算する方法と、種々の免疫学的測定法により直接セルロプラスミンの量を測定する方法がある。免疫学的測定法としては、通常のポリクローナル抗体を用いた免疫拡散法、免疫比濁法、ELISA法等がある。ウィルソン病は、治療との関連から早期発見が重要である。そのため、本願発明者等は乳児を対象に毛細管血あるいは乾燥濾紙血を用いたELISA法によるセルロプラスミン測定のマスキングを検討してきた。従来の測定法ではポリクローナル抗体を用いているため、非活性型であるアポセルロプラスミンと活性型であるホロセルロプラスミンを区別することができなかった。そこで、ウィルソン病を診断する上では、活性型のホロセルロプラスミンのみを測定することがより病態を反映するものと考え、ホロセルロプラスミンのみと反応するモノクローナル抗体を用いたELISA法を開発した(中村公俊他, J Jpn Society for Mass-screening, vol3, No2, 89-90, (1993))。

【0005】 しかし、一般にELISAの測定感度は非常に高く、セルロプラスミンの測定においても測定可能域はおおよそ1~50 $\mu\text{g/dl}$ であり高感度である。従って、一般健常人の血漿において17~37mg/dlに分布するセルロプラスミンを、通常のELISA法により血液を検体として測定する際には、適当な希釈溶液で数千倍に希釈する必要がある。このような被測定物質が多量に存在する被検試料の実際の測定においては、数段階に及ぶ希釈操作を経て被検試料を調製することを余儀なくされる。この被検試料調製操作は、測定者に多大な労力を課すと共に、希釈率の増大は誤差の増大に結び付くものである。従って、この被検試料の希釈操作に付随する問題は、解決されるべき重要な課題である。

【0006】

【課題を解決するための手段、発明の構成】 本願発明者等は、上述の問題点に鑑み、競合反応をサンドイッチ免疫学的測定方法に導入することによる被検試料の希釈操作を軽減する方法に着眼し、この方法を用いてセルロプラスミンを好適に測定できる方法の提供を課題として検討した。鋭意研究の結果、ハイブリドマ法の技術を用いてセルロプラスミンに対するモノクローナル抗体を調製し、当該モノクローナル抗体をマイクロプレートに固

50

3

定化し、抗原抗体反応時にこの固定化したモノクローナル抗体と反応性を同じくする遊離モノクローナル抗体を被検試料と共に添加することにより、被検試料中のセルロプラスミンに対して固定化抗体と遊離抗体が競合する免疫学的測定系を構築した。なお、遊離モノクローナル抗体の添加量については、被検試料中のセルロプラスミン量を考慮して、適宜増減され得る。この方法により、固相抗体側に結合するセルロプラスミン量を制限することが可能となり、従来不可欠であった希釈操作を低減あるいは削除することのできる本願発明を完成させるに至った。

【0007】以下、本願発明を概説する。本測定法の原理および測定法の概略を図1および図2に示した。今回の測定法では、一般にサンドイッチ型免疫学的測定方法として分類される測定系、すなわち定量を目的とする抗原に特異的な抗体を固相プレートに固着させ、ついで抗原試料を反応後、抗原に特異的に反応する標識抗体と反応させる原理に基づく測定系の一次反応(抗原抗体反応)時に、固相抗体と反応性を同じくする遊離抗体を被検試料と共に反応系に添加させることを大きな特徴とする。なお、本測定系の標識抗体に関しては、セルロプラスミンを認識するポリクローナル抗体あるいは固定化抗体とは異なるセルロプラスミン上のエピトープを認識するものであればどの部位を認識しているモノクローナル抗体を用いても本測定は可能である。以下に、遊離抗体を競合的に作用させる本発明を、サンドイッチELISAに適用した場合のセルロプラスミンの測定について概略を述べる。しかしながら、本発明は抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ型免疫学的測定方法を広く包含するものであり、サンドイッチELISAに限定されるものではない。サンドイッチ型RIA(放射免疫測定法)、蛍光物質あるいは化学発光物質を標識化したサンドイッチ型免疫学的測定法等も好適な態様と考えられる。

【0008】まず、あらかじめ用意した抗セルロプラスミンモノクローナル抗体をマイクロタイタープレートに吸着固定させる。アルブミンを用いブロッッキングを行なった後、ここにセルロプラスミンを含む被検試料と、マイクロタイタープレートに固定させたものと反応性を同じくする遊離モノクローナル抗体を同時に添加する。インキュベートし、洗浄後、酵素標識した抗ヒトセルロプラスミン抗体を加えインキュベートし、さらに洗浄後、基質を添加し、一定時間後に反応を停止し、基質の発色量を吸光度で測定すればよい。なお、本願発明に用いられる被検試料については特別な制約はないが、セルロプラスミンを含有する血液、血清あるいは血漿等を採取後、乾燥濾紙等の不溶性担体に分散させて保存し、測定時に溶出して測定試料とすることが、多数の被検試料の測定を余儀なくされるマスキングにおいては実

4

【0009】抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体は通常用いられている方法を参考にして調製すればよく、その概略は以下のごとくである。セルロプラスミンは正常ヒト血清より、硫酸塩析40%飽和の沈澱画分を採り、それらをセファクリルS300を用いたゲル濾過により青色の精製セルロプラスミンの画分を得る。得られたセルロプラスミンをマウスに免疫し、このマウスより得られた脾臓細胞と適当なミエローマ細胞とを融合し、ハイブリドーマを作製してこのハイブリドーマより、ヒトセルロプラスミンとのみ反応する抗体を産生するクローンを選択し、所望のマウスモノクローナル抗体を調製する。

【0010】標識抗体の調製法としては、固相抗体とは異なる部位を認識する抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製し、これをマウス腹腔内に接種し増殖させた腹腔液よりProtein Aカラムを用いて精製し、さらにペプシン処理後、そのP(ab)'₂を例えば石川等の方法に従いペルオキシダーゼで標識すればよい。または、得られた精製セルロプラスミンを適当なアジュバント、例えばフロイントのコンプリートアジュバントと共に、適当な動物、例えば山羊等に対して皮下接種して得られる免疫血清より精製したポリクローナル抗体を用いて同様にペルオキシダーゼで標識すればよい。

【0011】

【発明の効果】本発明において確立した測定系によって、ELISA法において従来不可欠であった被検試料の希釈操作を低減あるいは削除することのできるセルロプラスミンの好適な測定が可能となった。以下、本発明の理解を深めるために実施例に添って詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何等限定されるものではない。

【0012】

【実施例】

実施例 1

(抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体の調製)本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、精製ヒトセルロプラスミンを免疫原として、ケラーとミルシュタインの方法(Kohler and Milstein, Nature, 256 p, 495-497(1975))としてよく知られた方法を参考にして作製された。得られたハイブリドーマより調製された数十種の抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体のうち、CP2-23-5と命名された抗体を固相抗体および競合用抗体として選択した。こうして得られたモノクローナル抗体を実施例2に示すELISA法による測定に供した。なお上述のモノクローナル抗体はいずれもIgG1タイプのサブクラスに属し、代表的なモノクローナル抗体であるCP2-23-5を産生するハイブリドーマは、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-14466として寄託されている。

【0013】実施例 2

(競合抗体を用いたELISAによるヒトセルロプラスミンの測定)PBSよりなる抗体希釈液に抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を5 μ g/mlになるように溶解し、これを96ウエルマイクロタイタープレート(NUNC社製、IMMUNO MODULE MAXI SORP F8)に、1ウエル当たり150 μ lずつ添加し4℃で一晩静置した。各ウエルより上記抗体液を吸引除去し、マイクロプレート洗浄器(DYNATECH社製、ULTRA WASH II)を用いて洗浄後、1%アルブミン(生化学工業社製、Albumin Fraction V, Bovine)溶解液を300 μ l添加し、4℃で静置した。アルブミン溶液を吸引除去し、前記緩衝液で3回洗浄し測定ウエルとした。

【0014】別にペルオキシダーゼ標識した抗セルロプラスミン山羊抗体を準備した。また、PBSを基本とする緩衝液に、4 μ g/mlの濃度になるよう、マイクロタイタープレートに結合させたものと同種のモノクローナル抗体を希釈し、これを競合用抗体液とした。測定用ウエルに下記の方法で調製した測定試料を1ウエルあたり10 μ lずつ入れ、同時に競合用抗体液200 μ lを入れ、30℃で45分間放置し一次の抗原抗体反応を実施した。各ウエル中の反応液を吸引除去し、0.5%のTween 20を含むPBS (pH7.2)で4回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した抗ヒトセルロプラスミン抗体を1ウエル当たり100 μ lずつ加え、さらに45分間反応を行なった。同様に緩衝液で4回洗浄の後、基質溶液(OPD/ H_2O_2)100 μ lを各ウエルに添加後45分間遮光下で放置した後、2N硫酸を各ウエルに100 μ lずつ加え反応を停止した。攪拌し、各ウエルを均一にした後、492nmの吸光度を測定した。

【0015】実施例 3

(濾紙血液を測定試料とする競合用抗体を用いたELISAによるセルロプラスミンの測定)下記の方法で調製した濾紙血液測定試料3mm ϕ 1枚を用い、実施例2に示した測定ウェルおよび抗体液を用い、一次の抗原抗体反応を12時間行なうこと以外は、実施例2と同様の操作により測定した。高濃度のセルロプラスミンを含む被

検試料である血液の希釈系を市販の化学濾紙(東洋濾紙PKU用等)に50 μ l滴下し室温で風乾した濾紙血液試料を用い、競合用抗体を用いたELISAで測定して、その反応曲線を図3に示した。また対照として、競合抗体を含まない同様の系で測定した結果を白丸で示した。図に示したように、本測定方法により、1.0~約20mg/dl付近の測定範囲でセルロプラスミンが測定可能となり、一方、従来のELISA法での測定範囲は0.1~約2mg/dlである。対照と比較すれば、本測定法においては約10倍の希釈を削除できることとなり、希釈操作の問題を軽減することができる。

【0016】実施例 4

(血清または血漿を測定試料とする競合用抗体を用いたELISAによるセルロプラスミンの測定)下記の方法で調製した測定試料を用い、実施例2に示した測定ウェルおよび抗体液を用い、実施例2と同様の操作により測定した。高濃度のセルロプラスミンを含む被検試料である血清または血漿の希釈系を用い、競合用抗体を用いたELISAで測定し、その反応曲線を図4に示した。また対照として、競合抗体を含まない同様の系で測定した結果を白丸で示した。図に示したように、本測定方法により、0.02~約2.0mg/dl付近の測定範囲でセルロプラスミンが測定可能となり、一方、従来のELISA法での測定範囲は0.002~約0.2mg/dlである。対象と比較すれば、本測定法においては約10倍の希釈を削除できることとなる。

【0017】

【図面の簡単な説明】

【図1】本測定の原理および測定方法を示す図である。

【図2】本測定の原理および測定方法を示す図である。

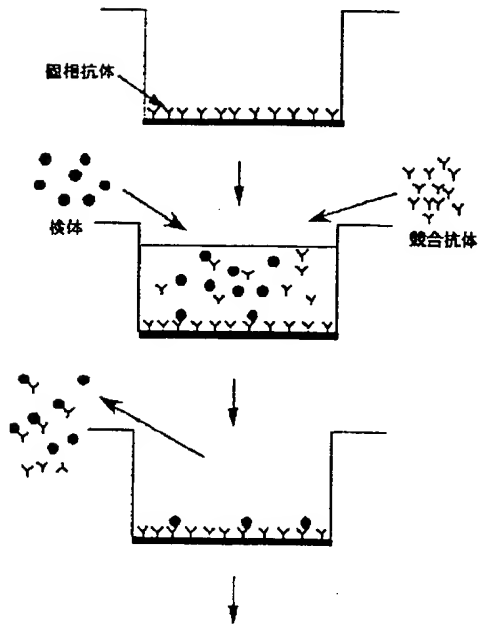
(図1の続き)

【図3】セルロプラスミン、競合用抗体を用いた濾紙血液を測定試料とするELISAでの反応曲線を示す図である。

【図4】セルロプラスミン、競合用抗体を用いた血清または血漿を測定試料とするELISAでの反応曲線を示す図である。

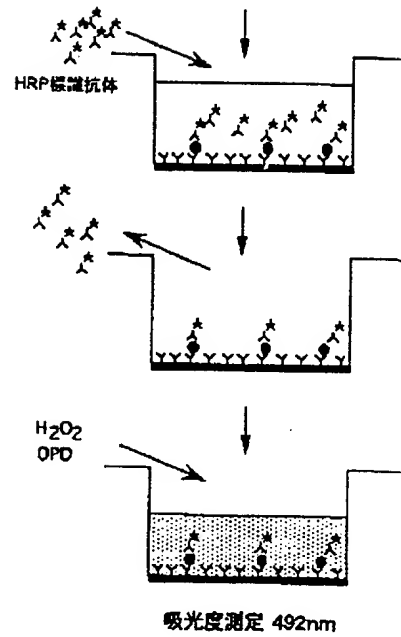
【図1】

反応原理及び測定方法

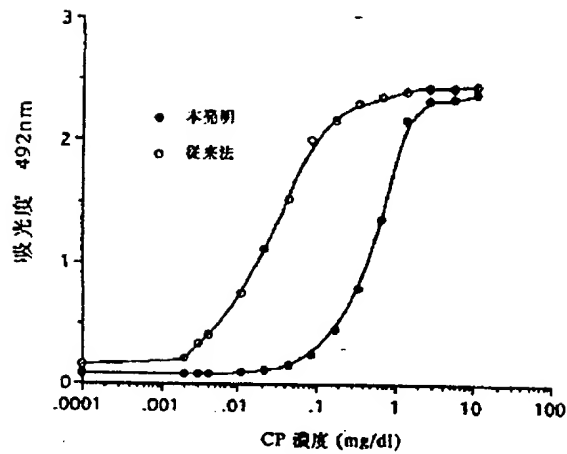


【図2】

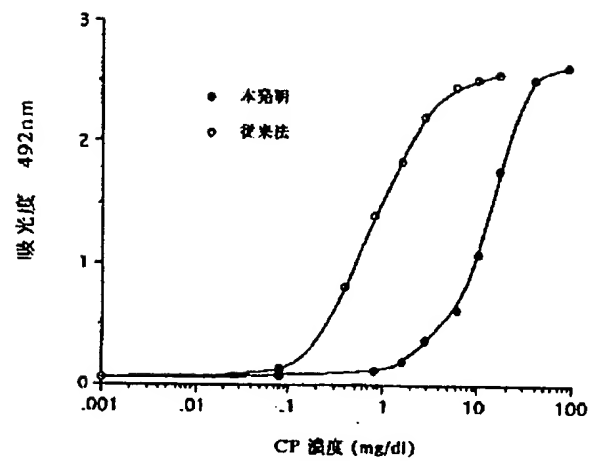
図1の続き



【図3】



【図4】



Japan Patent Office is responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to the measuring method of the biogenic substance and division ceruloplasmin using the antibody to a biogenic substance. In the measurement of the ceruloplasmin in blood based on [furthermore] sandwiched type immunoassay, such as enzyme immunoassay (it may be hereafter called ELISA for short), in a detail To the reaction time of a solid phase antibody and the ceruloplasmin in a specimen, the isolation antibody which makes a solid phase antibody and reactivity the same by adding to the specimen containing a ceruloplasmin. The competitive reaction to the ceruloplasmin produced between a solid phase antibody and an isolation antibody is used, and the amount which a ceruloplasmin combines with a solid phase antibody side is restricted. The method that pre-dilution operation of an indispensable specimen can be made to mitigate or delete thereby conventionally is offered. Therefore, this invention has utility value in a biogenic substance, and biochemical to measurement of a ceruloplasmin or the field in which medical meaning exists, for example, the field of a clinical diagnosis.

[0002]

[The trouble which the conventional technology and invention tend to solve] A ceruloplasmin has the molecular weight of 160,000, it is the blue plasma protein which contains copper at a rate of eight pieces in 1 molecule, and in case an appointment ceruloplasmin is compounded in liver, turns into a HOROSERURO plasmin which copper was incorporated and had oxidase activity, and circulates through the inside of blood. Although the role in copper metabolism has a still more unknown point, it is known that ceruloplasmin concentration is falling into the patient blood of Wilson's disease which is congenital **** at Tsuguaki (Neil A. Holtzman, et al., J. Clin. Invest., 46 and 6, 1967). That is, the amount of the ceruloplasmin which exists in plasma is distributed over 17 - 37 mg/dl by general healthy people, and most is 5 or less mg/dl in the Wilson disease person. From this, measurement of a ceruloplasmin is widely used for the diagnosis of Wilson's disease.

[0003] Wilson's disease is one of the congenital **** which make liver cirrhosis, an extrapyramidal-tract symptom, and a Kayser-Fleischer Arcus cornea three cardinal symptoms, and takes autosomal recessive heredity form. Although the origin of **** has many unknown points, this food copper taken in every day carries out superfluous accumulation at main internal organs, such as a liver, a cerebrum fundus, a cornea, or a kidney, and is considered to have caused the cytopathic of each organization, and sphaclation (Scheinberg IH, Sternlieb I: Wilson's disease, WB Saunders Co., Philadelphia, 1984). A cure is the medication and the copper diet food of metal chelate agents, such as a penicillamine and trien, which have the operation which combines with the copper which carried out deposition to the organization, and excretes copper outside of the body. Moreover, a prognosis is good if treatment is started at an early stage.

[0004] As a measuring method of a ceruloplasmin, there are a method of converting the amount of a ceruloplasmin from the oxidase activity measurement in a blood serum and measurement of a serum-copper value and the method of measuring the amount of a direct ceruloplasmin by various immunoassay. As immunoassay, there are an immunodiffusion technique using the usual polyclonal antibody, immunonephelometry, the ELISA method, etc. Relation with treatment to early detection is important for Wilson's disease. Therefore, the invention-in-this-application person etc. has examined the mass screening of the ceruloplasmin measurement by the ELISA method which used a capillary blood or dryness filter paper blood for the infant. By the conventional measuring method, since the polyclonal antibody was used, the appointment ceruloplasmin which is a non-active type, and the HOROSERURO plasmin which is an active type were undistinguishable. Then, when diagnosing Wilson's disease, measuring only an active HOROSERURO plasmin thought more reflecting symptoms, and it developed the ELISA method using the HOROSERURO plasmin and the monoclonal antibody which reacts (J Jpn Society for Mass-screening besides Kimiotoshi Nakamura, vol3 and No2, 89-90, (1993)).

[0005] However, generally the sensitivity of ELISA is very high, and also in measurement of a ceruloplasmin, a measurable region is about 1-50microg/dl, and is high sensitivity. Therefore, in case blood is measured as a sample by the usual ELISA method, it is necessary to dilute with suitable diluted solution the ceruloplasmin distributed over 17 - 37 mg/dl in general healthy people's plasma thousands times. It is obliged for such quality of a device under test to prepare a specimen through dilution operation of attaining to several step story, in actual measurement of the specimen which exists so much. While this specimen manufacture operation imposes a great effort on an operating personnel, increase of a dilution ratio is connected with increase with error. Therefore, the problem which accompanies dilution operation of this specimen is an important technical problem which should be solved.

[0006]

[A The means for solving a technical problem, composition of invention] The invention-in-this-application person etc. perceived the method of mitigating dilution operation of the specimen by introducing a competitive reaction into a sandwiched immunological measuring method in view of the above-mentioned trouble, and considered offer of the method of measuring a ceruloplasmin suitably using this method as a technical problem. The immunological system of measurement with which a fixed antibody and an isolation antibody compete to the ceruloplasmin in a specimen was wholeheartedly built by preparing the monoclonal antibody to a ceruloplasmin using the technology of the hybridoma method, fixing the monoclonal antibody concerned in a microplate, and adding the isolation monoclonal antibody which makes the same this fixed monoclonal antibody and reactivity at the time of an antigen-antibody reaction with a specimen as a result of research. In addition, about the addition of an isolation monoclonal antibody, it may fluctuate suitably in consideration of the amount of ceruloplasmins in a specimen. It becomes possible to restrict the amount of ceruloplasmins combined with a solid phase antibody side by this method, and came to complete the invention in this application which can reduce or delete the conventionally indispensable dilution operation.

[0007] Hereafter, the invention in this application is outlined. The principle of this measuring method and the outline of a measuring method were shown in drawing 1 and drawing 2. By this measuring method, it is characterized [big] by making the system of reaction add with a specimen the isolation antibody which makes a solid phase antibody and reactivity the same at the time of the first order reaction (antigen-antibody reaction) of system of measurement based on the principle which makes a solid phase plate fix an antibody specific to the antigen aiming at the system of measurement generally classified as a sandwiched type immunological measuring method, i.e., a fixed quantity, and makes an antigen sample react with the labelled antibody which reacts specifically after reacting subsequently to an antigen. In addition, this measurement is possible, even if it will use the monoclonal antibody which recognizes which part, if the epitope on a different ceruloplasmin from the polyclonal antibody or fixed antibody which recognizes a ceruloplasmin is recognized about the labelled antibody of this system of measurement. An outline is described about measurement of the ceruloplasmin at the time of applying this invention which makes an isolation antibody act on below in

used the anti-Homo sapiens ceruloplasmin monoclonal antibody which is not limited to Sandwiches ELISA. The sandwiched type immunoassay method which labeled sandwiched type radiolimmunoassay (radioimmunoassay), a fluorescent substance or the chemiluminescence matter is considered to be a suitable mode.

[0008] First, a microtiter plate is made to carry out adsorption fixation of the anti-ceruloplasmin monoclonal antibody prepared beforehand. After blocking using albumin, the isolation monoclonal antibody which makes the same the specimen which contains a ceruloplasmin here, the thing which the microtiter plate was made to fix, and reactivity is added simultaneously. What is necessary is to incubate, to add after washing the anti-Homo sapiens ceruloplasmin antibody which carried out enzyme labeling, to incubate, to add a substrate after washing further, to stop a reaction after fixed time, and just to measure the amount of coloring of a substrate with an absorbance. In addition, although there are no restrictions special about the specimen used for the invention in this application, it is practical to distribute insoluble support, such as a dryness filter paper, to save after extracting blood, a blood serum, or plasma containing a ceruloplasmin etc., and for it to be eluted at the time of measurement, and to consider as a measurement sample in the mass screening which is obliged to measurement of many specimens.

[0009] The outline is as the following that an anti-Homo sapiens ceruloplasmin monoclonal antibody refers to the method usually used, and should just prepare it. From the normal human serum, a ceruloplasmin takes the sedimentation fraction of 40% saturation of ammonium-sulfate salting-outs, and obtains the fraction of a blue refining ceruloplasmin by the gel filtration [they] using saphacryl S300. Immunity of the obtained ceruloplasmin is carried out to a mouse, the spleen cell obtained from this mouse and a suitable myeloma cell are united, the clone which produces the antibody which produces a hybridoma and reacts only with a Homo sapiens ceruloplasmin from this hybridoma is chosen, and a desired mouse monoclonal antibody is prepared.

[0010] What is necessary is to produce the hybridoma which produces the anti-Homo sapiens ceruloplasmin monoclonal antibody which recognizes a different part from a solid phase antibody as the method of preparation of a labelled antibody, to refine using an Protein A column from the peritoneal-cavity liquid which inoculates and proliferated this in mouse peritoneal cavity, and just to carry out the indicator of the F(ab)₂ by the peroxidase after pepsin processing according to the method of Ishikawa etc. further. Or what is necessary is just to carry out the indicator of the obtained refining ceruloplasmin by the peroxidase similarly using the polyclonal antibody refined from the immune serum obtained by carrying out subcutaneous vaccination to a suitable animal, for example, a goat etc., with a suitable adjuvant, for example, the complete adjuvant of Freund.

[0011]

[Effect of the Invention] Suitable measurement of the ceruloplasmin which can set by the ELISA method, and can reduce or delete dilution operation of the conventionally indispensable specimen by the system of measurement established in this invention was attained. Although an example is accompanied and it explains in detail hereafter in order to deepen an understanding of this invention, this invention is not limited to these examples at all.

[0012]

[Example]

Example-The hybridoma which produces the monoclonal antibody of one (manufacture of an anti-Homo sapiens ceruloplasmin monoclonal... antibody) this invention referred to the method well learned as a method (Kohler and Milstein, Nature, 258 p, 495-497 (1975)) of Keller and Milstein by having made the refining Homo sapiens ceruloplasmin into the immunogen, and was produced. The antibody named CP 2-23-5 among dozens of sorts of anti-Homo sapiens ceruloplasmin monoclonal antibodies prepared from the obtained hybridoma was chosen as a solid phase antibody and an antibody for competition. In this way, measurement by the ELISA method shown in an example 2 was presented with the obtained monoclonal antibody. In addition, the hybridoma which each above-mentioned monoclonal antibody belongs to the subclass of IgG1 type, and produces CP 2-23-5 which is a typical monoclonal antibody is the Agency of Industrial Science and Technology.

[0013] example The anti-Homo sapiens ceruloplasmin monoclonal antibody was dissolved in the antibody diluent which consists of 2(measurement of Homo sapiens ceruloplasmin by ELISA using competition antibody) PBS so that it might become [ml] in 5microg /, 96 well, it added on the microtiter plate (the product made from NUNG, IMMUNO MODULE MAXI SORP F8) 150microp one well / every, and this was gently put on it at 4 degrees C overnight. each - from the well, suction removal of the above-mentioned antibody liquid was carried out, 300microl addition of an albumin (Seikagaku make, Albumin Fraction V, Bovine) solution was done 1% after washing using the microplate scrubber (the product made from DYNATECH, ULTRA WASH II), and it put at 4 degrees C an albumin solution -- suction removal -- carrying out -- the aforementioned buffer solution -- 3 times -- washing -- measurement -- it considered as the well

[0014] The anti-ceruloplasmin goat antibody which carried out peroxidase labeling independently was prepared. Moreover, the thing which the microtiter plate was made to combine with the buffer solution based on PBS so that it may become 4microg / [ml] concentration, and the monoclonal antibody of the same kind were diluted, and this was made into the antibody liquid for competition. the object for measurement -- the measurement sample prepared by the following method was paid to the well 10microp one well / every, 200micro of antibody liquid / for competition was put in simultaneously, it was left for 45 minutes at 30 degrees C, and the primary antigen-antibody reaction was carried out each -- a well -- suction removal of the inner reaction mixture was carried out, by PBS (pH 7.2) containing 0.5% of Tween20, after 4 times washing, the anti-Homo sapiens ceruloplasmin antibody which carried out peroxidase labeling was added 100microp one well / every, and the reaction was performed for 45 more minutes the same -- 100micro (OPD/H 202) of substrate solutions / after the buffer solution washes [4 times] -- each -- 2-N sulfuric acid after leaving it under shading for after [addition] 45 minutes in a well -- each -- in addition to the well 100microl every, the reaction was stopped agitating -- each -- after making a well uniform, the absorbance of 492nm was measured

[0015] Example It measured by the same operation as an example 2 using the measurement well and antibody liquid which were shown in the example 2 using 3mm [of filter paper blood measurement samples prepared by the method of 3 (measurement of ceruloplasmin by ELISA using antigen-antibody reaction for 12 hours. Using the filter paper blood sample which trickled into the chemistry filter papers (for Oriental filter paper phenyl ketonuria etc.) of marketing of the dilution system of the blood which is a specimen containing a high-concentration ceruloplasmin 1 times 50micro, and was air-dried at the room temperature, it measured by ELISA using the antibody for competition, and the reaction curve was shown in drawing 3. Moreover, with a circle [white] showed the result measured as contrast by the same system which does not contain a competition antibody. As shown in drawing, a ceruloplasmin becomes measurable by the measuring range near 1.0 - about 20 mg/dl with this measuring method, and, on the other hand, the measuring range in the conventional ELISA method is 0.1 - about 2 mg/dl. If it compares with contrast, in this measuring method, about 10 times as many dilution as this can be deleted, and the problem of dilution operation can be mitigated.

[0016] Example It measured by the same operation as an example 2 using the measurement well and antibody liquid which were shown in the example 2 using the measurement sample prepared by the method of 4 (measurement of ceruloplasmin by ELISA using antibody for competition which makes blood serum or plasma measurement sample) following. Using the dilution system of the blood serum or plasma which is a specimen containing a high-concentration ceruloplasmin, it measured by ELISA using the antibody for competition, and the reaction curve was shown in drawing 4. Moreover, with a circle [white] showed the result measured as contrast by the same system which does not contain a competition antibody. As shown in drawing, a ceruloplasmin becomes measurable by the measuring range near 0.02 - about 2.0 mg/dl with this measuring method, and, on the other hand, the measuring range in the conventional ELISA method is 0.002 - about 0.2 mg/dl. If it compares with an object, in this measuring method, about 10 times as many dilution as this can be deleted.

[0017]

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The measuring method of the ceruloplasmin which uses as a specimen the biological material which did not perform dilution operation or performed dilution operation alternatively in the sandwiched type immunoassay method using the monoclonal antibody, and is characterized by adding the isolation antibody which makes a solid phase antibody and reactivity concerned the same to reaction time with the solid phase antibody which catches the ceruloplasmin and ceruloplasmin in a specimen, and making it produce competition between a solid phase antibody and an isolation antibody.

[Claim 2] The measuring method of the ceruloplasmin according to claim 1 whose sandwiched type immunoassay method is sandwiched enzyme immunoassay (it may be hereafter called Sandwiches ELISA for short).

[Translation done.]

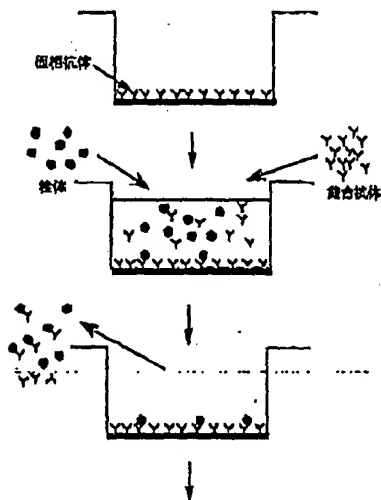
Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

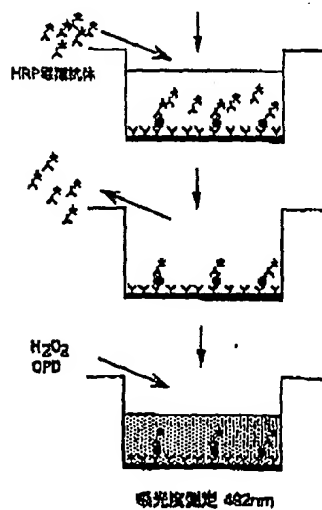
[Drawing 1]

反応原理及び測定方法

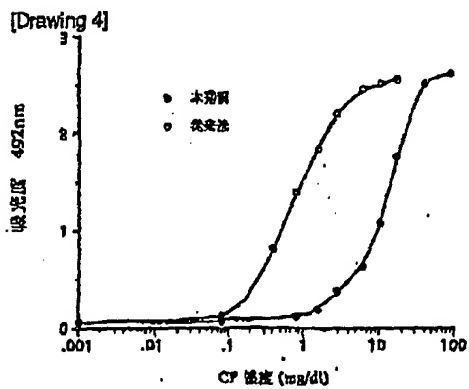
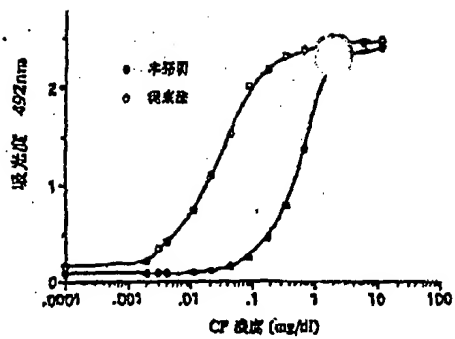


[Drawing 2]

図1の続き



[Drawing 3]



[Translation done.]